硫辛酸对甲醛诱导小鼠肝细胞DPC形成的抑制作用

梁思斯 曹 毅 王 昆 付 聪 肖 琳 丁书茂 袁均林 杨 旭

摘 要 **目的** 探讨甲醛所致氧化损伤与DNA-蛋白质交联关系。**方法** 将昆明小鼠分3组:对照组,3.0mg/m³甲醛气体染毒组,3.0mg/m³甲醛气体染毒并注射α-硫辛酸(LA)组,处理后测定其肝脏谷胱甘肽(GSH)含量与DNA-蛋白质分子交联(DPC)系数。**结果** 吸入3.0mg/m³甲醛气体组小鼠肝脏中GSH含量显著下降,DPC系数显著增大;吸入3.0mg/m³甲醛气体染毒并注射LA组小鼠GSH含量恢复到正常水平,DPC系数也恢复到正常水平。**结论** LA注射可抑制甲醛诱导小鼠肝细胞DPC的形成,DPC的产生与氧化损伤有一定的联系。

关键词 甲醛 氧化损伤 DNA-蛋白质交联(DPC) α-硫辛酸

Inhibitive Effects of Lipoic Acid on Formaldehyde Induced DNA-protein Crosslink Formation in Mice Liver. *Liang Sisi, Cao Yi, Wang Kun, Fu Cong, Xiao Lin, Ding Shumao, Yuan Junlin, Yang Xu. Laboratory of Environmetal Sciences, College of Life Sciences, Huazhong Normal University, zhejiang 430079, China*

Abstract **Objective** To explore the relation between oxidative damage and DNA-protein crosslink caused by formaldehyde. **Methods** Kun Ming mice were divided into 3 groups: control group, 3.0mg/m³ gaseous formaldehyde inhaled group, 3.0mg/m³ gaseous formaldehyde and lipoic acid (LA) treated group. The content of GSH and the amount of DPC were measured after exposure to formaldehyde. **Results** The content of GSH in liver cell decline significantly and the amount of DPC increased significantly after inhaled with 3.0mg/m³ gaseous formaldehyde. The content of GSH and DPC were both recovered to control group after treated with 3.0mg/m³ gaseous formaldehyde and LA. **Conclusion** LA injection could inhibit the formation of DPC in mice liver after exposure to formaldehyde. It is suggested that DPC is related with oxidative damage.

Key words Formaldehyde; Oxidative damage; DNA-protein crosslink; α-lipoid acid

甲醛(formaldehyde, FA)是一种常见的装修型化学性室内空气污染物,也是一种内源性有机化合物。它以来源广、毒性大、污染水平高、污染时间长等特点,已成为我国最主要、最严重的室内空气污染物之一。有关研究表明,甲醛是一种氧化剂,它可以与还原型谷胱甘肽(GSH)结合生成硫代半缩醛而导致GSH衰竭[1],从而降低机体的抗氧化能力。同时,各种终点效应的实验显示,甲醛可以引起DNA损伤,DNA-蛋白质分子交联(DPC)是DNA损害的主要形式[2]。为进一步探究甲醛所致氧化损伤与DNA-蛋白质交联的联系,本实验对昆明小鼠进行气态甲醛吸入式染毒,腹腔注射抗氧化剂α-硫辛酸(LA),进行如下研究。

材料与方法

1. 动物准备及组织匀浆的制备:(1)将15只SPF级雄性昆明纯系小鼠(由湖北省疾病预防控制中心提供,年龄4周,体重18~20g)随机分为3组:空白对照组、3.0mg/m³甲醛吸入组、3.0mg/m³甲醛吸入并注射LA组,每组5只小鼠。染毒前称小鼠体重。甲醛组与LA组小鼠从第1天15:40时开始气态甲醛连续染毒72h,染毒期间,每天给LA组小鼠腹腔注射LA[15mg/(kg·d)],对照组也在同样大小的染毒缸中接受过滤的新鲜空气(甲醛浓度<0.02mg/m³)。(2)两组染毒组小鼠置于玻璃染毒缸(8.4L通气式干燥器)中,用于染毒的甲醛气体采用纯品配制方案制备,即采用SIGMA公司生产的10%甲醛溶液原液,配制成不同浓度甲醛溶液,置于WH-2小型智能型环境气候舱通气湿度发生装置中,通过环境气候舱设定的恒定湿度参数,使之能稳定连续地输出实验所需浓度的气态甲醛。舱输出甲醛染毒气体的环境参数为:舱温度(23±0.5)℃;相对湿度(45±0.5)%;气流量为(1±0.01)L/min。气体的甲醛浓度由4160-2型甲醛测定仪测定,灵敏度为0.012 mg/m³,准确度为±0.024 mg/m³,数字显示读数。染毒期间,动物正常进食和饮水。染毒结束后再次称其体重,计算小鼠体重增长率。小鼠脱颈处死,立即取出肝脏,将其分为两份。一份用玻璃匀浆器在0~4℃下制成10%匀浆,然后在4℃下3000r/min离心10min,取上清液,立即进行GSH含量的测定。另一份暂时存放于-20℃冰箱中,留待测DPC。

2. 谷胱甘肽含量的测定:使用ThioGlo⁻¹检测法检测硫醇

基金项目:国家自然科学基金面上项目(30570799)

作者单位:430079 武汉,华中师范大学生命科学学院环境科学实验室

通讯作者:杨旭,电子信箱:yangxu@mail.ccnu.edu.cn

万方数据

状态[3]。ThioGlo^{-1}是一种低荧光试剂，当其与巯基基团反应后，会形成马来酰亚胺加合物（一种高荧光物质）。具体方法为，将50ml上清液加入150ml染料，随即将产物使用全自动荧光酶标仪FLx800于激发光379nM、发射光513nM处检测。使用标准GSH制备标准曲线，使用PBS配制终浓度分别为4、2、1、0.5、0.25、0.125、0.0625、0μM标准GSH，将50μl不同浓度标准溶液与150μl染料混合，使用全自动荧光酶标仪FLx800检测产物。标准曲线如图1所示，回归方程为回归方程：$y = -0.3151 + 0.0008x$，$R^2 = 0.9979$。使用标准曲线换算细胞内硫醇浓度。

3. 蛋白质含量测定：采用考马斯亮蓝试剂盒测定组织匀浆的蛋白含量，试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

4. DNA－蛋白质交联的检测：将肝组织样品用眼科剪剪成糜状，两层擦镜纸过滤，制得细胞悬液，用PBS清洗两次后再用1ml PBS重悬。采用KCl－SDS沉淀法检测，原理如下：首先加入SDS，让其与DPC及其他的蛋白结合，而不和自由的DNA结合；再向样品中加入KCl溶液使DPC和蛋白质沉淀下来，而自由的DNA留在上清液中。将上清液转移后，再向沉淀中加入蛋白酶K除去蛋白质，使DPC中的DNA游离出来，并用荧光法测定此DNA的含量A以及原液中DNA的含量B，计算DPC系数η，以此值表示DNA和蛋白质的交联程度，具体计算公式如下：$\eta = A/(A+B)\times 100\%$。KCl－SDS沉淀法操作参照文献[4]，并使用小牛胸腺DNA制备标准曲线。标准曲线如图2所示，回归方程为：$y = 2.4423 + 0.0028x$，$R^2 = 0.9974$。根据标准曲线来定量交联DNA和自由DNA，再计算DPC系数η。

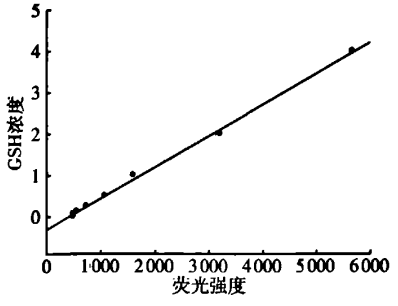

图1　GSH浓度的标准曲线

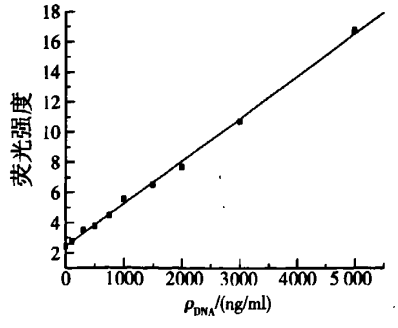

图2　DNA浓度的标准曲线

5. 统计学分析：采用Origin6.1统计软件对实验数据进行分析，并进行t检验和绘图。

结　果

1. 小鼠体重增长率：甲醛染毒和LA注射对小鼠体重增长率影响如图3所示。经甲醛染毒后，甲醛染毒组小鼠体重增长率较对照组有显著性的下降，LA组小鼠体重增长率显著性小于对照组与甲醛染毒组（$P<0.05$），提示甲醛染毒和LA注射对小鼠生理有一定影响，但具体原因还不清楚。

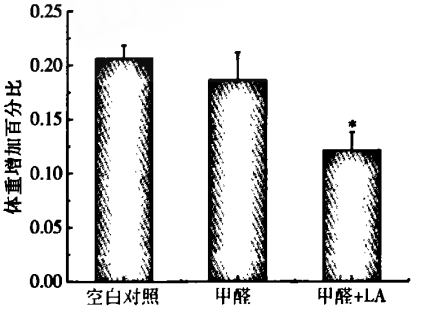

图3　小鼠体重增加百分比

*$P<0.05$，与空白组、甲醛组比较

2. GSH含量：如图4所示，经3.0mg/m^{3}甲醛吸入式染毒后，甲醛染毒组小鼠肝脏中GSH含量与对照组有极显著下降（$P<0.01$）；而腹腔注射LA组小鼠在甲醛暴露后，肝脏中GSH含量基本维持在正常水平。以上实验结果说明LA能再生GSH。

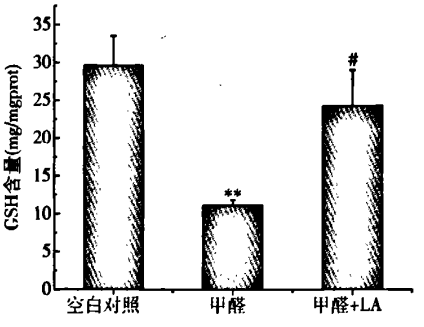

图4　甲醛处理后小鼠肝脏内GSH的含量

**$P<0.01$，与空白组比较；#$P<0.05$，与甲醛组比较

3. DPC的检测：本研究组以往的研究表明，气态甲醛可依剂量－效应关系诱导细胞DPC的形成[5]，因此本次实验选用3.0mg/m^{3}气态甲醛对小鼠进行染毒，结果见图5。当甲醛单独作用时，DPC系数有显著上升。而给小鼠腹腔注射LA后，DPC系数降低，与甲醛组具有显著性差异，但与对照组无显著性差异。该结果表

万方数据

明,LA 能抑制甲醛所致 DNA - 蛋白质交联。

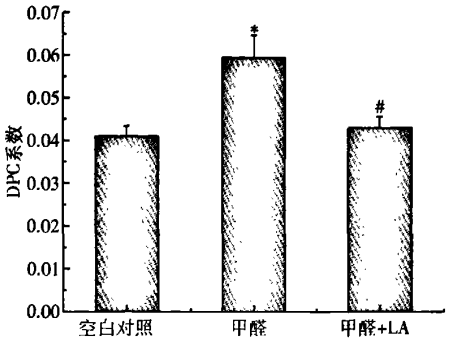

图 5 甲醛处理后小鼠肝脏内 DPC 系数

*$P<0.05$,与空白组比较;#$P<0.05$,与甲醛组比较

同时,结合图 4 可以看到,小鼠肝细胞 GSH 含量和 DPC 系数成负相关关系,即:甲醛单独染毒组与对照组比较,小鼠肝细胞 GSH 含量下降,DPC 系数上升;LA 注射组与甲醛单独染毒组比较,小鼠肝细胞 GSH 含量上升,DPC 系数下降。该结果提示,LA 可以再生肝脏 GSH,抑制甲醛所致 DNA - 蛋白质交联,甲醛诱导 DPC 的形成与氧化损伤存在一定关系。

讨 论

1. 甲醛的氧化损伤作用:自由基引起的氧化损伤是甲醛毒性作用的重要分子机制,机体内自由基的积累会引起生物大分子如 DNA、蛋白质以及脂质膜的氧化损伤。在正常情况下,细胞中的有关酶类和小分子物质的抗氧化效应可以拮抗自由基的损伤效应,氧化损伤与抗氧化防御体系的防御作用处于一种动态平衡中。在自由基过度产生或机体的抗氧化防御体系功能受损的情况下,过多的自由基会导致机体的氧化应激,自由基攻击靶分子,造成组织、器官及各种生物分子不同程度的损伤。通常用来衡量机体氧化损伤水平的指标有:脂质过氧化物,抗氧化酶的活力(SOD、GSH - Px 等),还原型谷胱甘肽的含量(GSH)和蛋白质羟基化等[6]。同时,有学者也认为,DPC 的形成与氧自由基也有一定关系,DPC 也可以作为氧化损伤的生物标志物。

2. 谷胱甘肽的抗氧化作用:谷胱甘肽是机体内最主要、含量最丰富的含巯基低分子肽,它能与活性氧族(ROS)反应,保护细胞免受氧化损伤[7],也可以抵抗诱导氧化应激的化学物质引起的细胞毒作用。另外,GSH 分子中半胱氨酸残基上的巯基具有强的亲核性质,可通过亲核取代和加成作用使有毒的亲电物质极性降低、毒性减弱[8]。同时,它也是谷胱甘肽过氧化物酶(GSH - Px)和谷胱甘肽硫转移酶(GST)两种酶类的底物,为这两种酶分解氢过氧化物所必需,要防止自由基对细胞的损伤,GSH - Px 必须维持具有一定活性。

3. DPC 作为氧化损伤指标的合理性:流行病学的研究表明,氧化损伤与慢性炎症、癌症有因果关系,其中活性氧(ROS)及氮类化合物的产生是氧化损伤的重要机制之一。经研究发现,受到氧化损伤的细胞除活性氧(ROS)及氮类化合物指标升高以外,还伴随有 DNA 损伤。因此有关学者认为,活性氧(ROS)及氮类化合物能直接与 DNA 反应,或先与细胞内其他成分反应继而进攻 DNA,从而导致 DNA 损伤。本研究发现,甲醛保留小鼠 GSH 含量下降,DPC 系数上升,而抗氧化剂 LA 能再生 GSH 含量,导致 PDC 系数下降,这些结果进一步提示机体氧化损伤可能导致 DPC,与上述理论相符。

综上所述,甲醛暴露后小鼠 GSH 含量降低,DPC 系数上升;而 LA 注射能再生 GSH,导致 DPC 系数下降,因此甲醛诱导 DPC 的产生与氧化损伤有一定的联系,但其具体机制还不清楚,有待进一步探讨,可能是由于氧化损伤产生的活性氧(ROS)及氮类化合物直接与 DNA 反应,或先与细胞内其他成分反应继而进攻 DNA,从而导致 DPC。

参考文献

1 崔香丽,雷玲,韩光,等. 甲醛对大鼠的氧化性损伤. 中国公共卫生学报,1995,14(5):287 - 289

2 Quievryn G, Zhitkovich A. Loss of DNA - protein crosslinks from formaldehyde - exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteosome function. Carcinogenesis, 2000,21(8): 1573 ~ 1580

3 Anna A,Shvedova, Elena Kisin, *et al*. Enhanced oxidative stress in the skin of vitamin E deficient mice exposed to semisynthetic metal working fluids. Toxicology,2002,176:135 - 143

4 王昆,曹毅,胡均猜,等. 血清和血浆对甲醛诱导性细胞内 DPC 形成的促进作用. 生态毒理学报,2006,1(2)

5 Peng G Y, Zhao W, Lu Z S, *et al*. Study on the effects of DNA - protein crosslinks induced by formaldehyde and its repair process. Acta Scientiae Circumstantiae, 2006,26 (2): 331 - 336

6 张瑾. 甲醛毒性的研究进展. 职业与健康,2006,22(23):2041 ~ 2044

7 Mary E. Anderson. Glutathione: an overview of biosynthesis and modulation. Chemico - Biological Interactions, 1998,111 - 112: 1 - 14

8 程时,丁海勤. 谷胱甘肽及其抗氧化作用今日谈. 生理科学进展,2002, 33 (1): 85 - 90

(收稿:2008 - 06 - 12)

万方数据